

网络出版时间:2013-01-25 17:23

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130125.1723.018.html>

垂枝香柏挥发油的化学成分与抑菌活性分析

董艳芳¹, 叶睿超², 郭彩霞¹, 周媛¹, 王丽³

(1 武汉市林业果树科学研究所, 湖北 武汉 430075; 2 自贡市园林科学研究所, 四川 自贡 643000;

3 四川大学 生命科学学院, 四川 成都 610064)

[摘要] **【目的】**探究垂枝香柏(*Sabina pingii*)挥发油的成分和药理作用,为其合理推广、开发与应用奠定基础。**【方法】**采用水蒸气蒸馏法提取垂枝香柏挥发油,并用GC-MS对垂枝香柏挥发油的化学成分进行分析;采用滤纸片扩散和平板涂布法测定垂枝香柏挥发油对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、蜡状芽孢杆菌、卡拉双球菌等4种细菌和白色念珠菌、玉米纹枯病菌等2种真菌生长的抑制性,以抑菌圈直径的大小衡量挥发油对供试菌种的抑菌活性。**【结果】**从垂枝香柏挥发油中共鉴定出63个成分,鉴定成分占总组分的96.63%,其中平均相对含量大于5%的有桉烯(Sabinene)、 α -可巴烯-11-醇(α -Copaen-11-ol)、烃类含氧衍生物(Hedycaryol)和4-萜品醇(4-Carvomenthenol)等4种物质;垂枝香柏挥发油对6种供试菌种的抑菌圈直径为11.74~14.32 mm,均为中度敏感。**【结论】**垂枝香柏挥发油富含萜类物质,且具有较强的抑菌活性。

[关键词] 垂枝香柏;水蒸气蒸馏法;挥发油;抑菌圈直径;抑菌活性

[中图分类号] Q946

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)03-0088-05

Analyses of components and antimicrobial activities of volatile oil from *Sabina pingii*

DONG Yan-fang¹, YE Rui-chao², GUO Cai-xia¹, ZHOU Yuan¹, WANG Li³

(1 Wuhan Science Research Institute of Forestry&Fruit-tree, Wuhan, Hubei 430075, China; 2 Zigong Science Research Institute of Landscape, Zigong, Sichuan 643000, China; 3 College of Life Science, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: **【Objective】** The components and pharmacological effects of volatile oil from *Sabina pingii* were studied to help reasonable exploitation, application and popularization of *S. pingii*. **【Method】** Volatile oil of *S. pingii* was extracted by steam distillation before its chemical compounds were analyzed by GC-MS. Then, filter paper diffusion method and plate coating method were used to determine its inhibitory effects against 4 bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella setuba*, *Bacillus cereus*, and *Diplococcus carthralis*) and 2 fungi (*Streptococcus albus* and *Rhizoctomicd soldni*). The diameters of inhibition zones were used to indicate the antimicrobial activities. **【Result】** 63 components were identified from the volatile oil of *S. pingii*, accounting for 96.63% of the total components. The components with relative contents of larger than 5% on average included sabinene, α -copaen-11-ol, hedycaryol, and 4-carvomenthenol. The diameters of inhibition zones of the volatile oil varied from 11.74 to 14.32 mm, which showed a moderate sensitivity. **【Conclusion】** Volatile oil of *S. pingii* was rich in terpenes substances, and had relatively strong antimicrobial activities.

Key words: *Sabina pingii*; steam distillation; volatile oil; inhibition zone diameter; antimicrobial activity

[收稿日期] 2012-05-24

[基金项目] 武汉市农科院攻关项目(Y1201220)

[作者简介] 董艳芳(1984—),女,湖北黄冈人,助理工程师,硕士,主要从事植物天然产物研究。E-mail:43980245@qq.com

[通信作者] 王丽(1968—),女,云南昆明人,教授,主要从事植物学研究。E-mail:yzxj@vip.163.com

垂枝香柏(*Sabina pingii* (Cheng ex Ferré)) 隶属于柏科(Cupressaceae)圆柏属(*Sabina*)^[1],是我国特有的Ⅱ级保护植物。垂枝香柏自然分布区域狭窄,仅在四川西南部及云南西北部海拔 2 600~3 800 m、高山立地条件较差的山脊上有分布^[2]。垂枝香柏林是大熊猫的重要生境,其木材细致、芳香、耐久用、坚硬、耐湿,是一优良用材树种,亦可做庭院树,也是一种重要的资源植物。

目前对垂枝香柏的研究主要集中在形态特征^[3]、生境分布^[4]、群落^[5]和遗传多样性^[6]等方面,对于其挥发油的化学成分和活性方面的研究尚未见报道。本研究采用水蒸气蒸馏法提取垂枝香柏挥发油,并用 GC-MS 对垂枝香柏挥发油的化学成分进行分析;通过体外抑菌试验,探讨挥发油对 6 种供试菌种生长的抑制作用,旨在初步探究垂枝香柏挥发油的化学成分和药理作用,为其合理推广、开发与应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原材料 垂枝香柏采自四川省阿坝州冶勒自然保护区,小枝和叶粉碎为粉末备用。

1.1.2 供试菌种 金黄色葡萄球菌(+) (*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(-) (*Salmonella setubal*)、蜡状芽孢杆菌(+) (*Bacillus cereus*)、卡拉双球菌(-) (*Diplococcus catarrhalis*)、白色念球菌(真菌) (*Streptococcus albus*)、玉米纹枯病菌(真菌) (*Rhizoctomica soldani*),均由四川大学微生物资源实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 垂枝香柏挥发油的提取 根据《中华人民共和国药典 2005 版》^[7]挥发油的提取标准,以水蒸气蒸馏法提取。称取垂枝香柏粉末 200 g,放入 1 000 mL 硬质圆底烧瓶中,加水至烧瓶 3/4 处,再放入玻璃珠数粒,密封瓶口,静置 2 d。连接挥发油测定器与回流冷凝管,自冷凝管上端加水至充满挥发油测定器的刻度部分,并溢流入烧瓶时为止。置电热套中加热至沸腾,并保持微沸约 5 h,至测定器中油量不再增加时停止加热。放置片刻,开启测定器下端的活塞,将水缓缓放出,至油层上端达刻度 0 线上面 5 mm 处为止。放置 1 h 以上,再开启活塞使油层下降至其上端恰与刻度 0 线平齐,得挥发油粗品。乙醚萃取挥发油粗品并用无水硫酸钠干燥,过滤,回收乙醚,得精制挥发油,计算挥发油提取率(%)。

挥发油提取率 = 精制挥发油量(g)/样品粉末量(g) × 100%。

1.2.2 垂枝香柏挥发油成分的 GC-MS 分析 色谱条件:HP5890 SERIES II 气相色谱仪;色谱柱为:HP-1(25 m × 2.0 mm × 0.33 μm),柱温 60 °C (1 min) $\xrightarrow{4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 250 °C (3 min);进样器 split/splittless,不分流周期 0.6 min,分流比 46 : 1;进样口温度 250 °C;检测器:FID,温度 270 °C;载气:He, 1.2 mL/min;尾吹 50 mL/min;燃烧气 H₂, 170 kPa;辅助燃烧气为空气,280 kPa;HP3396A 积分仪。质谱条件:HP5988 A 质谱仪,EI 70 eV,离子源温度 200 °C,灯丝发射电流 300 mA,接口温度 280 °C,扫描范围 45~450 amu。

1.2.3 垂枝香柏挥发油对供试菌种生长的抑制作用 采用滤纸片扩散和平板涂布法测定垂枝香柏挥发油对供试菌种生长的抑制作用。细菌采用 LB 培养基,真菌采用 PDA 培养基。将 6 种供试菌种配成菌悬液,血球计数板确定菌悬液的浓度,无菌水将菌悬液稀释成 10⁸ CFU/mL (菌落形成单位,CFU) 备用。用打孔器将吸水性强的滤纸打成直径 6 mm 的圆形纸片,干热灭菌后,贴于无菌平皿上,用微量移液器吸取 10 μL 精制挥发油,滴于纸片上,紫外灯下自然挥干,再贴于含菌平板上,每个平板贴 3 片,以干滤纸片作为空白对照,细菌再以 1.0 mg/mL 的氨苄青霉素作阳性对照。细菌于 37 °C 培养 24 h,真菌于 28 °C 培养 48 h。试验重复 3 次,测量滤纸片抑菌圈直径。滤纸片直径为 6 mm 时,抑菌圈直径 > 15 mm 为高度敏感,10~15 mm 为中度敏感,7~9 mm 为低度敏感^[8-9]。抑菌圈直径为 7 mm 时的浓度,定义为最低抑菌浓度(MIC),低于 7 mm 视为没有抑菌效果^[10]。

1.3 数据处理

测量数据采用 SPSS 软件进行处理,以“平均值 ± 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 垂枝香柏挥发油的提取率

从 200 g 样品粉末中提取得到精制挥发油 3.065 g,得率为 1.53%。

2.2 垂枝香柏挥发油的化学成分分析

将 GC-MS 联用分析所得各成分经质谱鉴定的相对含量列于表 1。由表 1 可知,共鉴定出 63 个成分,鉴定成分占总组分的 96.63%,其相对含量用气

相色谱面积归一化法求得。相对含量最高的为桉烯 (Sabinene),占 18.02%;平均相对含量大于 5%的还有 α -可巴烯-11-醇(alpha-Copaen-11-ol)、烃类含氧衍生物(Hedycaryol)、4-萜品醇(4-Carvomenthe-
nol);平均相对含量 5%~1%的有 α -侧柏烯(alpha-Thujene)、2-蒎烯(2-Pinene)和 γ -萜品烯(gamma-Terpinene)等 17 种物质。相对含量大于 1%的共有 21 种物质,它们的相对含量之和为 80.10%。

表 1 垂枝香柏挥发油各种化学成分及相对含量
Table 1 Components of volatile oil of *S. pingii*

序号 No.	成分 Components	相对含量/% Percentage
1	桉烯 Sabinene	18.02
2	α -可巴烯-11-醇 alpha-Copaen-11-ol	10.68
3	烃类含氧衍生物 Hedycaryol	8.65
4	4-萜品醇 4-Carvomenthenol	7.25
5	α -侧柏烯 alpha-Thujene	3.77
6	2-蒎烯 2-Pinene	3.56
7	γ -萜品烯 gamma-Terpinene	3.53
8	$\alpha,\alpha,4a$ -三甲基-8-亚甲基-十氢化-2-萘甲醇 2-Naphthalenemethanol, decahydro-8-methylene-alpha, alpha, 4a-trimethyl-, (2R)-(2-alpha, 4a-alpha, 8a-beta)	3.15
9	$\alpha,\alpha,4a,8$ -四甲基-1,2,3,4,4a,5,6,8a-八氢-2-萘甲醇 2-Naphthalenemethanol, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-, alpha, alpha, 4a, 8-tetramethyl	2.77
10	β -水芹烯 beta-Phellandrene	2.68
11	2-十三酮 2-Tridecankje	2.61
12	(+)-4-萜烯 (+)-4-Carene	2.22
13	反- β -松油醇 e- β -Terpinene	1.92
14	石竹烯 Caryophyllene	1.79
15	杜松 1(10),4 二烯 Cadina-1(10),4-diene	1.72
16	侧柏酮 Thujone	1.63
17	1,2-二异丙烯基环丁烷 1,2-Diisopropenylcyclobutane	1.56
18	顺- β -松油醇 cis-beta-Terpineol	1.55
19	异喇叭茶烯 Isoledene	1.32
20	γ -桉叶醇 gamma-Eudesmol	1.31
21	异丁香醇 Isocaryophillene	1.18
22	Δ -丁香三环烯 delta-Neoclovene	0.98
23	异松油烯 Terpinolen	0.96
24	γ -橄榄烯 gamma-Elemene	0.96
25	艾菊酮 Chrysanthone	0.91
26	反-松香芹醇 trans-Pinocarveol	0.81
27	丁基苯 Butylbenzene	0.80
28	氧化伞花烃 o-Cymene	0.76
29	3-(1-甲基-2-丙烯基)-1,5-环辛二烯 3-(1-Methyl-2-propenyl)-1,5-cyclooctadiene	0.74
30	2-十一酮 2-Undecanone	0.69
31	6-杜松醇 tau-Cadinol	0.65
32	4-亚甲基-1-甲基-2-(2-甲基-1-丙烯基)-1-乙烯基-环庚烷 Cycloheptane, 4-methylene-1-methyl-2-(2-methyl-1- Propen-1-yl)-1-vinyl	0.61
33	1-甲基-2-异丙基-1-羟基-4-环乙烯 2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethy)-, trans-	0.59
34	2-十五烷酮 2-Pentadecanone	0.53
35	2-壬酮 2-Nonanone	0.51
36	大叶香根烯-D-4-醇 Germacrene D-4-ol	0.51
37	1,2,3,4,5,6-六甲基-1,3-环己二烯 1,3-Cyclohexadiene, 1,2,3,4,5,6-hexamethyl	0.44
38	愈创醇 Guaiol	0.44
39	2-萜烯 2-Carene	0.43
40	α -松油醇 alpha-Terpineol	0.43
41	α -依兰油烯 alpha-Muurolene	0.38
42	β -香叶烯 beta-Myrcene	0.36
43	1-乙烯基-1-甲基-2,4-二(1-甲基乙烯基)-环己烷 Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)	0.34
44	石竹烯氧化物 Caryophyllene oxide	0.33

续表 1 Continued table 1

序号 No.	成分 Components	相对含量/% Percentage
45	6,7-二甲基-1,2,3,5,8,8a-六氢萘 6,7-Dimethyl-1,2,3,5,8,8a-hexahydronaphthalene	0.28
46	2-甲基-2-(3-甲基-2-氧代丁酮)-1-环己酮 1-Cyclohexanone,2-methyl-2-(3-methyl-2-oxobutyl)	0.25
47	大叶香根烯-D Germacrene-D	0.21
48	反对孟烯-3-醇-1 trans-p-Menth-1-en-3-ol	0.20
49	撒拜娜酮 Sabina ketone	0.19
50	9-番松酮 9-Cedranone	0.18
51	E-金合欢烯环氧化合物 Farnesene epoxide,E	0.18
52	1,2,3,4,4a,5,6,8a-八氢-7-甲基-4-亚甲基-1-(1-甲基乙基)-萘 Naphthalene,1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methy-4-methylene-1-(1-methylethyl)	0.17
53	(+)-表二环倍半水芹烯 (+)-epibicyclos-esquiphellandrene	0.17
54	异戊酸丁乙酯 Isobutyl isovalerate	0.16
55	1,5-薄荷二烯-7-醇 1,5-Menthadien-7-ol	0.14
56	1,4-对薄荷二烯-7-醇 p-Mentha-1,4-dien-7-ol	0.13
57	顺鞭草烯醇 (s)-cis-Verbenol	0.13
58	β-蒎烯 2(10)- Pinene	0.11
59	香茅油 Apple oil	0.11
60	2,4,6-三甲基-3-环乙烯-1-羧基醚 3-Cyclohexene-1-carboxaldehyde,2,4,6-trimethyl	0.11
61	α-石竹烯 alpha-Caryophyllene	0.10
62	α-甲基-[4-甲基-3-戊烯基]环氧乙烷基甲醇 Alpha-Methyl-alpha-[4-methyl-3-pentenyl]oxiranemethanol	0.08
63	γ-橄榄烯 gamma-Elemene	0.07

2.3 垂枝香柏挥发油的抑菌效果

垂枝香柏挥发油对 6 种供试菌种的抑菌作用见表 2。由表 2 可见,卡拉双球菌抑菌圈最大,为(14.32±1.02) mm,阳性对照为(34.62±0.97) mm;沙门氏菌抑菌圈最小,为(11.74±0.17) mm,阳性对照为(7.20±0.36) mm。抑菌圈大小顺序为

卡拉双球菌>金黄色葡萄球菌>蜡状芽孢杆菌>玉米纹枯病菌>白色念球菌>沙门氏菌。

这 6 种供试菌对垂枝香柏挥发油的敏感程度均为中度敏感,其中沙门氏菌、蜡状芽孢杆菌的敏感度高于阳性对照;卡拉双球菌最为敏感,较接近高度敏感程度。

表 2 垂枝香柏挥发油对 6 种供试菌的抑菌作用

Table 2 Antimicrobial activities of volatile oil of <i>S. pingii</i> to 6 microorganisms			
供试菌种 Bacterium tested	阳性对照质量浓度/ (mg · mL ⁻¹) Mass concentration of positive probe	挥发油抑菌圈 直径/mm Inhibition zone diameters of volatile oil	阳性对照抑菌圈 直径/mm Inhibition zone diameters of positive probe
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	1.0	14.27±1.01	16.40±0.19
沙门氏菌 <i>Salmonella setubal</i>	1.0	11.74±0.17	7.20±0.36
蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	1.0	13.67±0.17	12.23±0.22
卡拉双球菌 <i>Diplococcus catarrhalis</i>	1.0	14.32±1.02	34.62±0.97
白色念球菌 <i>Streptococcus albus</i>	—	12.19±0.16	—
玉米纹枯病菌 <i>Rhizoctomicd soldnic</i>	—	12.24±0.18	—

注:“—”表示未设阳性对照或无抑菌圈。
Note:“—”means no positive probe or inhibition zone.

3 讨 论

体外抑菌试验是筛选抗菌药物或测试新药抗菌性能的重要环节。本研究结果表明,垂枝香柏挥发油对 6 种供试菌种均具有较好的抑制性,且未表现出 G⁺、G⁻ 的专一性,这说明垂枝香柏具有较好的抑菌潜质,具有广谱抑菌的特性,与植物天然产物的抑菌特性一致^[11]。

萜类物质是植物挥发油的主要成分,在生物体内起着极其重要的作用^[12-13],参与形成酯类、防御毒剂、成长激素等。Muller-Riebau 等^[14]研究了 130 种精油成分及单萜衍生物对 8 种多状菌的抗真菌活性,发现萜类的单碘化乙酸酯有很强的抗真菌活性,在 250 mg/L 下,能完全抑制多状菌的发育。

本试验通过 GC-MS 联用仪对垂枝香柏挥发油的成分进行了分析,鉴定出相对含量较高的几种物

质桧烯、烃类含氧衍生物、4-萜品醇、 α -侧柏烯等均属于萜类或萜类物质衍生物。垂枝香柏挥发油富含萜类物质的特性预示了其抑菌活性较强,和本试验抑菌活性的结果相符,这为垂枝香柏的进一步研究奠定了理论基础。

[参考文献]

- [1] 郑万钧. 中国树木志 [M]. 北京:中国林业出版社,1985.
Zheng W J. Woody flora of China [M]. Beijing:China Forestry Press,1985. (in Chinese)
- [2] 管中天. 四川植物志 [M]. 成都:四川人民出版社,1983.
Guan Z T. Flora of Sichuan [M]. Chengdu:People's Press of Sichuan,1983. (in Chinese)
- [3] 王开军. 垂枝香柏的森林演替和特性研究 [J]. 四川林业科技, 1998,19(4):43-49.
Wang K J. Study on forest succession and characteristic of *Sabina pingii* [J]. Journal of Sichuan Forestry Science and Technology,1998,19(4):43-49. (in Chinese)
- [4] 四川森林编辑委员会. 四川森林 [M]. 北京:中国林业出版社, 1990.
The Editorial Committee of Forestry of Sichuan. Forestry of Sichuan [M]. Beijing:China Forestry Press,1990. (in Chinese)
- [5] 李松茂,叶先华,曾永海,等. 四川冶勒自然保护区垂枝香柏年龄结构研究 [J]. 四川大学学报:自然科学版,2007,44(1): 186-190.
Li S M,Ye X H,Zeng Y H,et al. Age structure of *Sabina pingii* in Yele Natural Reserve of Sichuan Province [J]. Journal of Sichuan University:Natural Science Edition,2007,44(1):186-190. (in Chinese)
- [6] 叶睿超,陈 照,董艳芳,等. 冶勒自然保护区垂枝香柏遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 四川大学学报:自然科学版,2009,46(4):1207-1212.
Ye R C,Chen Z,Dong Y F,et al. Primary studies on the genetic diversity of *Sabina pingii* (Cheng ex Ferre) in Yele Nature Reserve by ISSR [J]. Journal of Sichuan University:Natural Science Edition,2009,46(4):1207-1212. (in Chinese)
- [7] 中国药典编委会. 中华人民共和国药典 2005 版 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2005.
The Editorial Committee of Chinese Pharmacopoeia. Chinese pharmacopoeia 2005 [M]. Beijing:The Medicine Science and Technology Press of China,2005. (in Chinese)
- [8] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程 [M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,1997.
Department of Medical Administration, Ministry of Public Health,China. Clinical laboratory operating procedures of China [M]. 3rd ed. Nanjing,Southeast University Press,1997. (in Chinese)
- [9] 王 萍,吴冬青,李彩霞. 旋覆花乙醇提取物的抗氧化性与抑菌作用研究 [J]. 中国医学理论与实践,2005,15(1):142-143.
Wang P,Wu D Q,Li C X. Studies on antioxidant and antimicrobials activities of *Inula japonica* ethanol extract [J]. Theory and Practice of Chinese Medicine,2005,15(1):142-143. (in Chinese)
- [10] 刘华玲,马欣荣,孙振元. 地锦叶片正丁醇提取物的抑菌作用 [J]. 林业科学研究,2007,20(6):872-875.
Liu H L,Ma X R,Sun Z Y. Antimicrobial activity from *Parthenocissus* of n-butanol extract tricuspidata leaves [J]. Journal of Forestry Research,2007,20(6):872-875. (in Chinese)
- [11] Sagdic O,Ozcan M. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols [J]. Food Control,2003,14(3):141-143.
- [12] 姚新生. 天然药物化学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2003.
Yao X S. Natural pharmaceutical chemistry [M]. Beijing:People's Health Press,2003. (in Chinese)
- [13] 田光辉,刘存芳,赖普辉. 抱茎蓼花的挥发油成分及其抗菌活性的研究 [J]. 时珍国医国药,2008,19(7):163-166.
Tian G H,Liu C F,Lai P H. Studies on constituents and antimicrobial activities of the essential oil from the flower of *Polygonum amplexicaule* [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research,2008,19(7):163-166. (in Chinese)
- [14] Muller-Riebau F,Beger B,Yegen O. Chemical composition and fungi toxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils selected aromatic plants growing wild in Turkey [J]. Food Chemistry,1995,43:2262-2266.